

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号  
特表2001-501475  
(P2001-501475A)

(43)公表日 平成13年2月6日(2001.2.6)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
1/19		1/19	
// (C 1 2 N 1/19			
C 1 2 R 1:72)			

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 50 頁)

(21)出願番号 特願平10-516085  
(86) (22)出願日 平成9年10月3日(1997.10.3)  
(85)翻訳文提出日 平成11年4月5日(1999.4.5)  
(86)国際出願番号 P C T / C U 9 7 / 0 0 0 0 5  
(87)国際公開番号 W O 9 8 / 1 4 6 0 0  
(87)国際公開日 平成10年4月9日(1998.4.9)  
(31)優先権主張番号 8 2 / 9 6  
(32)優先日 平成8年10月3日(1996.10.3)  
(33)優先権主張国 キューバ (C U)  
(81)指定国 E P (A T, B E, C H, D E, D K, E S, F I, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M C, N L, P T, S E), A U, B R, C A, C N, F I, J P, R U, U S

(71)出願人 セントロ デ インジエニエリア ジエネ  
テイカ イ バイオテクノロジー (シーア  
イジービー)  
キューバ国12100 シウダド デ ラ ハ  
バナ, プラヤ, キューバナキャン, アベニ  
ダ 31 エントレ 158 イ 190  
(72)発明者 ロドリゲス, メノカル, ルイス  
キューバ国12100 シウダド デ ラ ハ  
バナ, プラヤ, キューバナキャン, カレ  
186 ナンバー 3115 エントレ 31 イ  
33, アパートメント 5 ビー  
(74)代理人 弁理士 浅村 皓 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 カンジダ・ウチリスにおけるトランスフォーメーション系

(57)【要約】

本発明は、酵母*Candida utilis*における異種タンパク質の発現に有用なトランスフォーメーションシステムを提供するものであり、これは、この種における栄養素要求突然変異体の取得ならびにその栄養素要求突然変異体を補足するゲノムライブラリーからの異種遺伝子の単離に基づくものである。本発明のトランスフォーメーションシステムは、*Candida utilis*のNRRL Y-1084株から得られた単新規な栄養素要求突然変異株を宿主として使用する。これらの突然変異株は、選択マーカーとして上記酵母の遺伝子URA3ならびにH I S3を含有するプラスミドでトランスフォームされた主としてウラシルおよびヒスチジン経路における欠損を有する。

**【特許請求の範囲】**

1. 酵母カンジダ・ウチリス (*Candida utilis*) のトランスフォーメーションシステムにおいて、組換えDNAでトランスフォーム可能な宿主酵母細胞を使用し、この宿主は少なくとも1つの生合成経路が欠損しているシステム。

2. 少なくとも1種のアミノ酸の生合成経路が欠損している宿主酵母細胞を使用する「請求項1」記載の酵母*Candida utilis*のトランスフォーメーションシステム。

3. ウラシル生合成経路が欠損している宿主酵母細胞を使用する「請求項2」記載の酵母*Candida utilis*のトランスフォーメーションシステム。

4. 宿主酵母細胞は酵素オロチジン-5-リン酸デカルボキシラーゼの活性が欠損している「請求項3」記載のトランスフォーメーションシステム。

5. 宿主酵母細胞は*Candida utilis* NRRL Y-1084 CUT35 (寄託番号未定) である「請求項4」記載のトランスフォーメーションシステム。

6. 少なくともヒスチジンの生合成経路が欠損している宿主酵母細胞を使用する「請求項2」記載の酵母*Candida utilis*のトランスフォーメーションシステム。

7. 宿主酵母細胞は酵素イミダゾール-グリセロールリン酸デヒドロターゼの活性が欠損している「請求項6」記載のトランスフォーメーションシステム。

8. 宿主酵母細胞は*Candida utilis* NRRL Y-1084 TMN3である「請求項7」記載のトランスフォーメーションシステム。

9. 組換えDNA材料は宿主に欠損している生合成経路の欠損を補足する機能性遺伝子を含有する「請求項1」記載のトランスフォーメーションシステム。

10. 機能性遺伝子は*Candida utilis*の遺伝子URA3である「請求項9」記載のトランスフォーメーションシステム。

11. 組換えDNA材料はプラスミドpURA5ならびにpUCURA3である「請求項10」記載のトランスフォーメーションシステム。

12. 機能性遺伝子は*Candida utilis*のHIS3遺伝子である「請求項9」記載のトランスフォーメーションシステム。

13. 組換えDNA材料はプラスミドpHCU37ならびにpHCU40である「請求項12」記載のトランスフォーメーションシステム.

14. 酵母カンジダ・ウチリス (*Candida utilis*) の酵母宿主細胞において, 組換えDNAによりトランスフォームが可能であり, その宿主は少なくとも1つの生合成経路が欠損している酵母宿主細胞.

15. 宿主細胞は, 少なくとも1種のアミノ酸の生合成経路が欠損している「請求項14」記載の酵母宿主細胞.

16. 宿主細胞は, 少なくともウラシルの生合成経路が欠損してい「請求項15」記載の酵母宿主細胞.

17. 宿主細胞は酵素オロチジン-5-リン酸デカルボキシラーゼの活性が欠損している「請求項16」記載の酵母宿主細胞.

18. 宿主細胞は*Candida utilis* NRRL Y-1084 CUT35 (寄託番号未定) である「請求項17」記載の酵母宿主細胞.

19. 宿主細胞はヒスチジンの生合成経路が欠損している「請求項15」記載の酵母宿主細胞.

20. 宿主細胞は酵素イミダゾール-グリセロールリン酸デヒドロターゼの活性が欠損している「請求項19」記載の酵母宿主細胞.

21. 宿主細胞は*Candida utilis* (NRRL Y-1084) TMN3株である「請求項20」記載の酵母宿主細胞.

22. *Candida utilis*の酵母宿主細胞をトランスフォームできる組換えDNA材料において, この組換えDNA材料は宿主に欠損している生合成経路の欠損を補足する機能性遺伝子を含有する組換えDNA材料.

23. 機能性遺伝子は*Candida utilis*のURA3遺伝子である「請求項22」記載の組換えDNA材料.

24. 組換えDNA材料はプラスミドpURA5ならびにpUCURA3である「請求項23」記載の組換えDNA材料.

25. 機能性遺伝子は*Candida utilis*のHIS3遺伝子である「請求項22」記載の組換えDNA材料.

26. 組換えDNA材料はプラスミドpHCU37ならびにpHCU40である「請

求項25」記載の組換えDNA材料.

27. 酵母*Candida utilis*のトランスフォーメーション操作において,

(a) *Candida utilis*の酵母宿主株をアルカリ金属塩により処理し,

(b) 工程(a)における細胞生成物をトランスフォーメーションに適切な条件下に組換えDNA材料と接触させ,

(c) 酵母宿主株のエレクトロポレーションに適切な条件下にトランスフォーメーションを進行させ.

(d) 工程(c)の細胞生成物を培養培地の選択条件下にプレーティングする各工程からなる操作.

28. 工程(a)において使用されるアルカリ金属塩は濃度50mMの酢酸リチウムである「請求項27」記載の操作.

29. 工程(b)におけるトランスフォーメーションに適切な条件は,

—酢酸リチウムの塩で処理した細胞懸濁液と組換えDNAの混合物の容量と等容量の70%ポリエチレングリコール(PEG)溶液を加え,

—30℃で60分間インキュベートし,

—混合物を42℃で5分間処理して熱ショックを起こさせ, ついで

—氷で5分間冷却する

ことからなる「請求項27」記載の操作.

30. 工程(c)における酵母宿主細胞のエレクトロポレーションに適切な条件は,

—3.5kV/cmの電場,

—800Ωの抵抗, および

—25μFの静電容量

である「請求項27」記載の操作.

31. 酵母*Candida utilis*のトランスフォーメーション操作において, 組換えDNA材料でトランスフォーム可能な酵母宿主細胞を使用し, この宿主は少なくとも1つの生合成経路が欠損している「請求項27」記載のトランスフォーメーション操作.

32. 少なくとも1種のアミノ酸の生合成経路が欠損している酵母宿主細胞を使

用する「請求項31」記載の操作.

33. ウラシル生合成経路が欠損している酵母宿主細胞を使用する「請求項32」記載の操作.

34. 酵母宿主細胞は酵素オロチジン-5-リン酸デカルボキシラーゼの活性が欠損している「請求項33」記載の操作.

35. 酵母宿主細胞はCandida utilis NRRL Y-1084 CUT35 (寄託番号未定) である「請求項34」記載の操作.

36. 少なくともヒスチジンの生合成経路が欠損している酵母宿主細胞を使用する「請求項32」記載の操作.

37. 酵母宿主細胞は酵素イミダゾール-グリセロールリン酸デヒドロターゼの活性が欠損している「請求項36」記載の操作.

38. 酵母宿主細胞はCandida utilis NRRL Y-1084 TMN3である「請求項37」記載の操作.

39. 組換えDNA材料は宿主に欠損している生合成経路の欠損を補足する機能性遺伝子を含有する「請求項31」記載の操作.

40. 機能性遺伝子はCandida utilisの遺伝子URA3である「請求項39」記載の操作.

41. 組換えDNA材料はプラスミドpURA5ならびにpUCURA3である「請求項40」記載の操作.

42. 機能性遺伝子はCandida utilisの遺伝子HIS3である「請求項39」記載の操作.

43. 組換えDNA材料はプラスミドpHCU37ならびにpHCU40である「請求項42」記載の操作.

44. Candida utilisのURA3遺伝子をコードするDNA配列 (配列番号: 1) .

45. Candida utilisのHIS3遺伝子をコードするDNA配列 (配列番号: 3) .

46. Candida utilisのINV1遺伝子をコードするDNA配列 (配列番号: 5) .

**【発明の詳細な説明】**

カンジダ・ウチリスにおけるトランスフォーメーション系

**技術分野**

本発明は遺伝子操作およびバイオテクノロジーの分野に関し、さらに詳しくは酵母、カンジダ・ウチリス (*Candida utilis*) の遺伝子のトランスフォーメーションのための宿主-ベクターシステムの開発に関し、これは、この酵母における異種タンパク質の発現および分泌を可能にし、またさらに数種の目的で使用する事ができる。

**従来技術**

遺伝子操作およびバイオテクノロジーは、医学的、栄養学的または工業的に興味のある多くのタンパク質の製造に全く予想されなかったゴールを開き、優れた利点が報告されている。

これらの目的には、細菌の大腸菌が、それらの遺伝子系における知識、操作の容易性およびそれらの高密度における培養系により、多くのバイオテクノロジー系の会社で最も頻繁に使用されてきた。

しかしながら、この微生物における関心タンパク質の製造の希望は様々な因子によって影響される。第一に、得られた製品がヒトの医薬または食品としての使用を意図する場合には、大腸菌の細胞壁における発熱性物質ならびに毒性化合物がその使用を限定する規制の原因となっている。さらに、大腸菌内で過剰発現されるタンパク質は一般に、分泌されない不溶性の型で出現する。他方、転写、翻訳および翻訳後修飾の機構が真核細胞系の場合とは異なり、天然起源のものとは何らかの点で異なる組換えタンパク質を生じる。

真核細胞系たとえば酵母における異種タンパク質の製造の可能性は、原核細胞系に比較してある種の利点がある。とくに、高い細胞密度まで増殖できる能力、およびそれらの培養を連続システムに適用できる可能性を挙げることができる。また、酵母は大腸菌に比較し、培養培地中にかなり大量のタンパク質を分泌することが可能であり、しかも酵母の増殖に用いられる増殖培地の方が経済的である

(Lemoine, Y., 1988, Heterologous expression in yeast. 8th. International

Biotechnology Symposium, Paris, July, 17-22) . また、これらの系では細菌系には存在しない他の翻訳後修飾たとえばグリコシル化を実施することができる (Fiers, W., 1988, Engineering Maximal Expression of Heterologous Gene in Microorganism. 8th. International Biotechnology Symposium, Paris, July, 17-22) . これに加えて、これらのシステムは一般的に、高等真核細胞系の場合と同一のコドン使用におけるある種の優先性を有する (Kigsman, S.M. ら, 1990, Heterologous Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae*, Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 3, Ed. G.E. Russell) .

このすべてが、新しい真核細胞トランスフォーメーションシステムの開発ならびに普及を招来し、最初にとくに興味のある酵母サッカロミセス属の種、とくに *Saccharomyces cerevisiae* について報告された。しかしながら、サッカロミセスにおけるタンパク質の発現は、それらの同種プロモーターを使用して得られる発現レベルならびに培地中に分泌されるタンパク質の過剰グリコシル化の問題に直面した。それが近年、あまり慣用されていない酵母を異種タンパク質の発現に使用する研究を助長することになった主要な理由である。他の非サッカロミセス酵母たとえば *Hansenula polymorpha*, *Pichiapastoris*, および *Kluyveromyces* ( *Kluyveromyces* ) 属の酵母 (Sudbery, P., 1994, *Yeast* 10:1707-1726) におけるトランスフォーメーションシステムの開発とともに、これらのシステムの知識および開発における急速な進歩がもたらされ、またワクチン接種、診断および工業的目的でこれらのシステムにおいて発現された異種タンパク質の数も増加してきた。

カンジダ属内でも、これらの多くはヒトで日和見疾患を起こすことからすべて医学的にきわめて興味のある *Candida tropicalis*, *Candida boidiini*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida maltosa* および *Candida albicans* を含めて数種のトランスフォーメーションおよび発現系が報告されている。

カンジダ属においてカンジダ・ウチリス (*Candida utilis*) はその特殊な特性によりとくに興味をもたれている。まず第一に、*Candida utilis* は多様な安価な炭素源、とくにキシロース、スクロースおよびマルトースを使用する。他の興

味ある特徴はそれが連続培養において大量の細胞を効率的に産生できることである。Candida utilisはまた、Saccharomyces cerevisiaeおよびKluyveromyces fragilisと同様に、FDA（食品医薬局）によって食品の安全な原料として認可されている。さらに、Candida utilisはとくに、L-グルタミン、酢酸エチルおよびインベルターゼの製造に工業的に使用されている。

Candida utilisにおけるトランスフォーメーション系の予備的なシステムは1984年にHo, I. らにより記載されている (Biotechnology and Bioengineering Symp. 14:295-301)。この報告は、薬物抵抗性マーカーの存在およびトランスフォーメーション過程の直接的証明が開示されていないことから不完全である。最近Candida utilisにおけるトランスフォーメーション系に関して新たな戦略がKondo, K. ら、1995によって報告された (J. Bacteriol. 177:7171-7177)。彼らはシクロヘキシミド (CYH) 抵抗性のトランスフォーマントを、抵抗性を付与するリボソームタンパク質L41の突然変異型を含有するマーカー遺伝子を使用することにより得て、またCYH抵抗性トランスフォーマントの選択のためにマーカーを多重コピー中に存在させる必要から、プラスミドの組込みのための多重コピー標的としてもリボソームDNA (rDNA) を使用した。

これまでにCandida utilisを異種遺伝子発現のための宿主として用いる多くの試みがなされてきたにもかかわらず、栄養素要求突然変異株を用いるCandida utilisでのトランスフォーメーション操作は現在まで開発されていない。

Candida utilisの工業的利用で得られた知識およびその遺伝学における新規性を考慮すれば、それは異種タンパク質の発現系としての経済的利用性から魅力的な微生物であると考えられる。

#### 発明の開示

本発明の目的は、酵母Candida utilisにおける異種タンパク質の発現に有用な、この種の栄養素要求突然変異株の取得ならびにこの栄養素要求突然変異株を補足するゲノムライブラリーからの異種遺伝子の単離に基づく、トランスフォーメーション系を提供することであった。

本明細書に記載のトランスフォーメーション方法はCandida utilis宿主細胞内にDNAフラグメントまたは配列を導入し、遺伝子発現およびタンパク質製造



用の宿主系としての*Candida utilis*の使用を可能にする手段を提供する。

さらに、トランスフォームされた酵母細胞は、本発明に記載された方法により同定し、選択することができる。新規な*Candida utilis*の株、ベクターおよびサブクローンが提供される。新規な酵母株は組換えDNAフラグメントの導入のための宿主として使用される。

本発明はさらに、マーカーが酵母のゲノムに相同にインテグレートされる安定なトランスフォーメーションおよび宿主細胞におけるDNAの維持に関する。

本発明は具体的には、酵母*Candida utilis*内のトランスフォーメーション系から構成され、上記酵母のNRRL Y-1084株から単離される新規な栄養素要求突然変異株を宿主として使用する。これらの突然変異株は、ウラシルの生合成経路における酵素、オロチジン-5'リン酸デカルボキシラーゼが欠損していて、先行技術 (Sherman, F. ら, 1986, Laboratory course: Manual for methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY) から既知のUVおよび突然変異試薬NTGの両者を使用する古典的な突然変異誘発によって得られた。これらの突然変異株は高い安定性 (復帰頻度は約 $10^{-8}$ ) を示し、本発明に記載の操作により効率的にトランスフォームすることができる。加えてそれは、*Candida utilis*の突然変異株の選択マーカーとして、オロチジン-5'リン酸デカルボキシラーゼ酵素をコードするURA3ならびにイミダゾールグリセロールリン酸デヒドラターゼ酵素をコードするHIS3を単離した。これらはpUC19中の*Candida utilis*の遺伝子ライブラリーから単離されて、大腸菌株MC1066中でそれぞれpyrFおよびhisb463突然変異の補足によって同定された。同様に、*Saccharomyces cerevisiae*株SEY2202の突然変異ura3を使用してこの遺伝子が*Candida utilis*に由来することを確認した。これらの遺伝子の完全な配列を決定したところ、推定アミノ酸配列は他の酵母およびカビからの同じ遺伝子の配列と高い類似性を示している。

トランスフォーメーションシステムに用いられたベクターは、*Candida utilis*突然変異体宿主の相同の位置に相同組換えによりインテグレートできるURA3遺伝子からなる、プラスミドpURA5およびpUREC3であった。

本発明はまた、異種タンパク質を得るために*Candida utilis*から単離される

突然変異体のトランスフォーメーションに用いられる以前に記載されたプラスミドに基づくプラスミドのセットを提供する。

本発明のトランスフォーメーションシステムは、*Candida utilis*のNRRL Y-1084株から得られた新規栄養素要求突然変異株を宿主として使用する。これらは、主としてウラシルおよびヒスチジン経路に欠損を有し、とくに、それらの特性により、突然変異体CUT-35 (ura<sup>-</sup>) および突然変異体TMN-3 (his<sup>-</sup>) が選択された。

#### 実施例：

##### 実施例1：*Candida utilis*の突然変異誘発

微生物におけるトランスフォーメーションシステムの開発には、一般的に3つのエレメントが要求される。すなわち、

- (1) 栄養素要求または優性マーカーであり得るトランスフォーマントの選択のためのマーカー、
- (2) この選択のための突然変異体または適当な宿主、および
- (3) 宿主に細胞外DMAを効率的な型で再現性よく導入する方法

である。第二の目的を達成するため、酵母、*Candida utilis*に古典的な突然変異誘発が行われた。選択された酵母株 (NRRL Y-1084) の培養液をY P G培地 (酵母エキス1%，ペプトン2%，グルコース2%) 100mlに接種し、振盪器中30℃で10～20時間インキュベートした。培養液50mlを3000rpmで5分間遠心分離した。ついで、細胞を滅菌クエン酸緩衝液0.1M (pH5.5) で2回洗浄し、同じ緩衝液50mlに再懸濁した。次に、この懸濁液10mlをNTGの溶液で、終濃度50mg/mlに接種した。懸濁液を30℃に30分間静置してインキュベートした。

懸濁液を蒸留水で2回洗浄してNTGを除去した。細胞をY P G 50mlに再懸濁し、ついで100mlのY P Gを含むエルレンマイヤーフラスコに移した。突然変異細胞のこの培養液を30℃で48時間インキュベートした。

##### ナイスタチンによる増菌

48時間Y P G発現培養液約5mlを最小培地100mlの接種に使用した。抗生物質による増菌に使用した最小培地 (YNB, 酵母窒素ベース) は欠損が期待さ

れる生合成経路によって産生される代謝物を補充しなかった。たとえばウラシルの栄養素要求突然変異株の単離には、ウラシルを培地に添加しない。

インキュベーションは培養液の光学密度 (OD) が開始時のODの20~30%に達するまで続けた。培養液が所望のODに到達した時点で、細胞液を25単位/mlのナイスタチン溶液で処理した。抗生物質を含む溶液を30℃で30分間攪拌せずにインキュベートした。細胞懸濁液を蒸留水で2回洗浄して培地からナイスタチンを除去し、ついで細胞を150~200コロニー/プレートになるように適当な容量に再懸濁した。

#### スクリーニングおよび選択

実施例1による突然変異コロニーを含有するプレートをウラシルの存在下および不存在下にYNB培地中で平板培養した。ウラシルの不存在下に増殖しなかったコロニーを採取し、さらに分析に付した。

ura3またはura5突然変異体の存在を特異的に同定するためには、細胞を5-フルオロト酸 (5-FOA) の存在下に増殖させた。抵抗性コロニーはura3またはura5様突然変異体として選択された。

#### 実施例2 : ura3突然変異体の単離

ナイスタチンによる増菌後、培養液を蒸留水で2回洗浄し、 $0.75 \mu\text{g/ml}$ の5-FOA (5-フルオロ-オロト酸, Fluka) および $40 \mu\text{g/ml}$ のウラシルを含有するYNBプレート上に直接プレーティングした。プレートを4日間インキュベートし、増殖したコロニーをura<sup>-</sup>表現型をチェックするために分析した。 $4 \times 10^4$ の生存細胞から、ナイスタチン増菌後、79のコロニーが5-FOAに抵抗性を示した。これらのコロニーはura3, ura5または単に5-FOAに抵抗性であった。ウラシル栄養素要求を確認するために、想定される突然変異体をYNB培地中にプレーティングし、30℃で48時間インキュベートして、ウラシルの存在下または不存在下にYNBプレート中で複製させた。計67のコロニーがウラシルの不存在下にYNB中で増殖できず、ura<sup>-</sup>表現型を示した。

これらのすべての突然変異体の復帰の頻度は23の突然変異体のグループを観察することで決定し、 $10^{-8}$ のオーダーの復帰頻度を認めた。これはそれらにトランスフォーメーション系の宿主として使用できる安定性を付与するものである。

ウラシル栄養素要求突然変異株すべてのオロチジン5'-モノリン酸デカルボキシラーゼ (ODCase) 活性は, Yoshimotoら, 1978 (Methods Enzymol. 51:74-79) の方法によって決定し, 同時にそれはそれらの増殖条件を決定した. 結果は表1に示す.

表1. より重要な *ura3*, 突然変異体の特性の要約

名称	復帰頻度	ODCase 活性	増殖
CUT35	$<5 \times 10^{-7}$	—	+++
CUT43	$<1 \times 10^{-7}$	—	+++
CUT61	$<1 \times 10^{-8}$	—	+++
CUT65	$<1 \times 10^{-8}$	—	++
CUT70	$<1 \times 10^{-8}$	—	+
CUT88	$<7 \times 10^{-7}$	—	+++
CUT93	$1 \times 10^{-8}$	—	+++
CUT166	$6 \times 10^{-8}$	—	+++

### 実施例3: 表現型 *ura<sup>-</sup>* の異なる他の突然変異体の単離

ウラシル以外の異なる様々な栄養素要求突然変異体を得ることを目的に, ナイスタチン増菌によって得られた細胞懸濁液をYPG中でプレーティングし, 30°Cで50時間インキュベートした. 次にYPGプレートに含まれるコロニーをYNB培地を含むプレート上で複製させ, 30°Cで48時間インキュベートした. YNBプレート中で増殖できなかったコロニーを採取し, さらに分析した.

約2411個のコロニーをスクリーニングした結果, 2%の栄養素要求突然変異体が出現した. これらの突然変異体をHollidayおよびFinchan試験を使用してチェックした. 90%の *his<sup>-</sup>* 突然変異体 that 得られ, 2%は表現型 *lys<sup>-</sup>* に, 1%は表現型 *leu<sup>-</sup>* に, 1%は表現型 *met<sup>-</sup>* に, 1%は表現型 *ade<sup>-</sup>* に応答し, 5%は単純な栄養素要求表現型を示さなかった (Naa).

復帰頻度  $10^{-7}$  ~  $10^{-8}$  を示す突然変異体を更なる分析のため選択した (表2).

表 2

名称	表現型	復帰頻度
TMN3	his <sup>-</sup>	$1 \times 10^{-8}$
TMN31	his <sup>-</sup>	$1 \times 10^{-8}$
TMN64	his <sup>-</sup>	$1 \times 10^{-8}$
TMN9	his <sup>-</sup>	$4 \times 10^{-7}$
TMN12	his <sup>-</sup>	$5 \times 10^{-7}$
TMN13	his <sup>-</sup>	$2.5 \times 10^{-7}$
TMN62	his <sup>-</sup>	$8 \times 10^{-7}$
TMN74	his <sup>-</sup>	$2 \times 10^{-7}$
TMN78	his <sup>-</sup>	$2 \times 10^{-7}$
TMN45	lys <sup>-</sup>	$8 \times 10^{-6}$
TMN71	his <sup>-</sup>	$2 \times 10^{-6}$
TMN82	Naa	$2 \times 10^{-6}$

#### 実施例4 : *Candida utilis*のゲノムライブラリーの構築

*Candida utilis* NRRL Y-1084から抽出した染色体DNAを酵素Sau3Aで部分消化し、低点ゲル温度アガロース (LGT) 中電気泳動によって6~9kbの間のサイズのフラグメントを単離した。これらのフラグメントを予めBamH Iで消化しアルカリホスファターゼで処理した pUC19ベクター中にライゲートした。このライゲーション混合物を大腸菌MC1066 (F', D Lac<sup>+</sup>74, hsr, hsm, rps1, gal U, galK, tripC9030F, leuB, pyrF::tn5) 株にトランスフォームした。ゲノムライブラリー中にほぼ95%の組換え体を得られた。

#### 実施例5 : *Candida utilis*からのURA3遺伝子の単離

*Candida utilis* ura3宿主のトランスフォーメーションのためのマーカーとして、*Candida utilis*からURA3遺伝子を単離して、特性を解析した。*Candida utilis* URA3遺伝子を含むDNAフラグメントを*Candida utilis* pUC19ゲノムライブラリーから、*Saccharomyces cerevisiae*からのURA3遺伝子が大腸菌のpyrF突然変異を補足することを考慮し、大腸菌内の偶発性のプロモーター活性を用い、大腸菌のpyrF突然変異を補足する能力により単離した。この

ライブラリーをウラシル欠損培地上に播いた場合、12個の独立した $\text{pyrF}^+$ コロニーが単離された。これらのクローンの2種（pURA-2およびpURA-5）には、HindIIIおよびEcoRI制限消化を用いてpUC19上のDNAに同じ2.6kbゲノムの*Candida utilis*を挿入させた。両プラスミドからのDNAは、大腸菌MC1066から $\text{Ura}^+$ に高頻度にトランスフォームされた。*Candida utilis* URA3遺伝子-pUC19組換えプラスミド（pURA-5）の1つの地図を図1に示す。このプラスミドをさらに補足および配列分析に使用した。

#### 実施例6：Candida utilis URA3遺伝子の境界および配列の分析

プラスミドpURA5を、数種の制限酵素で消化した。EcoRI（1.9kb）、HincII（1.3kb）、SacI（1.1kb）消化に相当するフラグメントをそれぞれpBluescript SK（+）にサブクローニングして、プラスミドpUREc-3、pURHinc-1、pURSac-4が得られた。プラスミドpURSac-4に相当するフラグメントは大腸菌の $\text{pyrF}$ 突然変異を補足できなかった（図2）。

*Candida utilis*のURA3遺伝子を含有する1.9kb EcoRIフラグメント（pURREc-3、図3）を、Sangerら（1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467）の方法により完全に二重鎖配列を決定した。

この目的では、M13mp/pUCシリーズのユニバーサルオリゴヌクレオチドならびにその配列由来の内部オリゴヌクレオチドを用いた。1179bpのEcoRIフラグメントの完全配列を図4に示す（配列番号：1, 2）。このフラグメントは800bp（266コドン）のオープンリーディングフレームを含有する。*Candida utilis*のURA3遺伝子は、理論的分子量29,436Daのタンパク質をコードする。ATG開始コドンに隣接するヌクレオチド配列（GAAAATG）は酵母についてCigan & Donahue, 1987（Gene 59:1-18）により報告された配列（A/YAA/YAATG）によく一致する。

3'-非翻訳領域には、大部分の真核細胞遺伝子の3'-末端領域に存在する推定ポリアデニル化部位（TATAAAA, コンセンサスAATAAAA）を含有する（Guo, Z. & Sherman, F., 1995, Mol. Cell. Biol. 15:5983-5990）。

#### 実施例7：Saccharomyces cerevisiaeにおける補足の分析

クローン化されたフラグメントが*Candida utilis* URA3遺伝子に相当し、

サプレッサー活性をもつフラグメントではないことを確証するため、pURA5プラスミドの2.8kb Kpn I/Xba I フラグメントをpBR322誘導体ベクター（pBSARTR-3）にクローン化した。pBSARTR-3ベクターはいずれも*Saccharomyces cerevisiae*由来の自律複製配列（ARS1）ならびにTRP1遺伝子選択マーカーを有する。したがって、プラスミドpUT64（図5）を得、これを用いて、以前にItoら、1983（J.Bacteriol. 153:163-168）によって報告された酢酸リチウム法で*Saccharomyces cerevisiae*株SEY2202（ura-52-, leu2-112, his3）をトランスフォームした。

トランスフォーメーション後48時間にトランスフォーマントを得た。複製可能なプラスミドの存在は、コロニーハイブリダイゼーションおよびサザンブロット実験の両者を用いてチェックした。

得られたトランスフォーメーションの頻度（ $2\sim5\times10^2$  transf/mg）は、他の酵母からの他の栄養素要求マーカーについて文献に報告された値と一致する。すなわち*Candida utilis*からの遺伝子URA3は*Saccharomyces cerevisiae*のura3突然変異を補足できることが証明された。

実施例8：LiAc法を用いたプラスミドpURA5およびpUCURA3による*Candida utilis* NRRL Y-1084 CUT35のトランスフォーメーション

*Candida utilis* CUT35のura3突然変異株（寄託番号：未定）をItoら、1983（J.Bacteriol. 153:163-168）によって報告された酢酸リチウム法で、以前に*Candida utilis*から単離されたURA3遺伝子を選択マーカーとして使用してトランスフォームした。トランスフォーメーション系に用いられたベクター（pURA5およびpUCURA3）は、相同組換えによって*Candida utilis*突然変異株の相同位置に直接インテグレートされるように設計された。プラスミドpUCURA3は*Candida utilis* URA3遺伝子の1.8kb EcoR I フラグメントをベクターpUC19の相当部位にクローニングして得られた（図6）。トランスフォーメーション操作の前に、両プラスミドを構造遺伝子の5'プライムに存在するXho I で消化した。プラスミドの線状化がゲノム遺伝子座への相同インテグレーションには好ましい。

使用した操作は無傷の酵母細胞のアルカリ金属陽イオン処理に基づくもので、

基本的には*Saccharomyces cerevisiae*について報告されたのと同じ方法により100mMに代えて50mMのLiAcで処理した。トランスフォーマントの選択はウラシルを欠くYNB最小培地中で実施した。これらのトランスフォーマントの分裂安定性は、相同インテグレーションの機構により高かった。トランスフォーメーションの頻度は、組込み型ベクターを用い*Saccharomyces cerevisiae*および他の非慣用酵母について報告された値に一致する(表3)。

実施例9：エレクトロポレーション法を使用したプラスミドpURA5およびpUCURA3による*Candida utilis* CUT35のトランスフォーメーション

*Candida utilis* CUT35のura3突然変異株を、以前に単離された*Candida utilis*からのURA3遺伝子を選択マーカーとして使用してKondo, K. ら, 1995 (J. Bacteriol. 177:7171-7177) によって報告されたエレクトロポレーション法でトランスフォームした。トランスフォーメーションシステムに使用したベクター(pURA5およびpUCURA3)は相同組換えにより*Candida utilis*突然変異株の相同位置に直接インテグレートされるように設計された。

使用された操作は無傷の酵母細胞の電場での処理に基づくものである。以下の条件：パルスとして0.7kV (3.5kV/cm), 800Ωの抵抗, ならびに静電容量25μFを用いた。

トランスフォーメーション操作の前に、ゲノム遺伝子座への相同インテグレーションを容易にするため、両プラスミドを構造遺伝子の5'プライムに存在するXhoIで消化した。

トランスフォーマントの選択はウラシルを欠くYNB最小培地中で実施した。

pURA5およびpUCURA3の両者を用いたトランスフォーメーションの頻度はプラスミドの濃度に依存した。両方法(LiAcおよびエレクトロポレーション法)の比較を表3に示す。



表 3

ベクター	DNA濃度 ( $\mu\text{g}$ )	トランスフォーメーション頻度 ( $\text{transf}/\mu\text{g}$ )	
		LiAc	エレクトロポレーション
pUCURA-3	0.1	—	70~90
	0.5	—	640
	3.0	22	—
pURA-5	0.1	—	40~50
	0.5	—	670
	3.0	21	—

これらのトランスフォーマントの分裂安定性は、インテグレーションの機構により高かった。

トランスフォーメーションの頻度は、組込み型ベクターを用い*Saccharomyces cerevisiae*および他の非慣用酵母について報告された値に一致する。

図7には*Candida utilis*のゲノムにおけるインテグレーション現象の可能性ならびに一部のトランスフォーマントのサザンブロットを示す。

#### 実施例10:*Candida utilis*のHIS3遺伝子の単離

*Candida utilis*からHIS3遺伝子を単離して、実施例4に前述したライブラリーから特性を調べた。*Candida utilis*のHIS3遺伝子を含有するDNAフラグメントを、*Saccharomyces cerevisiae*からのUIS3遺伝子が大腸菌のhisb463突然変異を補足することを考慮し、大腸菌内の偶発性のプロモーター活性を用い、大腸菌KC8 (hsd, hisB463, leuB6, pyrF::Tn5<sup>r</sup>, trp 9830 (lact YA), stm, galU, gal) におけるhisb463突然変異を補足する能力によって*Candida utilis*のゲノムライブラリーから単離した。

HIS3遺伝子を単離するためには、 $10^5$ の細胞をウラシル、トリプトファンおよびロイシンを補充した最小培地(M9)上に播いた。この培地中で増殖が可

能で、したがって大腸菌KC8突然変異株におけるhisb463突然変異を補足できるコロニーからプラスミドDNAを抽出した。単離されたプラスミドDNAを用いて大腸菌KC8突然変異株をトランスフォームした。突然変異株のヒスチジン要求性を補足できるすべてのプラスミドをpHCUと命名した。his<sup>+</sup>コロニーがCandida utilisのHIS3遺伝子を含む、サプレッサー活性をもつADNフラグメントではないことを確認するため、his<sup>+</sup>トランスフォーマントから得られた2種のプラスミド（pHCU37およびpHCU40）をPCR反応に付した。酵母およびカビからの5種のIGPDase配列中に高度に保存された2つの領域からの2種の縮重オリゴヌクレオチドを使用した。縮重オリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチドならびにアミノ酸配列を図8に示す。

Candida utilisからのHIS3遺伝子のコード配列に相当する約500bpのPCRバンドを増幅した。サザンブロットによりCandida utilisゲノムDNAにハイブリダイズすることが示された約500bpのPCRフラグメントをT-ベクター（pMOSBLUE, Amersham）中にクローン化し、その配列の推定アミノ酸翻訳が他の酵母およびカビからのHis3pに高度に一致することを示した。このプラスミドpHCU37（図9）を用いてCandida utilisからのHIS3遺伝子の全配列を決定した。

#### 実施例11：Candida utilisのHIS3遺伝子の配列決定

Candida utilisからのHIS3遺伝子はSangerら（1977）の方法を使用して完全に二重鎖配列を決定した。M13mp/pUCシリーズのユニバーサルオリゴヌクレオチドを用いた。PCRフラグメントから採取したプライマーを全遺伝子の配列決定の開始に使用した。総長1190bpのpHCU37の配列を決定した。Candida utilisからのHIS3遺伝子の全配列を図10に示す（配列番号：5および6）。

このフラグメントは210コドンのオープンリーディングフレームを含む。Candida utilisのHIS3遺伝子は、理論的分子量24,518Daのタンパク質をコードする。

#### 実施例12：Candida utilisのインベルターゼをコードするINV1遺伝子の単離

*Candida utilis*中の酵素インベルターゼをコードする *INV1*遺伝子を単離するためには、この酵素のアミノ酸配列が異なる種の間で高度に保存された領域を提供する事実を利用した。すなわち、酵母からの $\beta$ -フルクトフラノシダーゼの配列をアラインした。上記PCRに使用した2種の縮重オリゴヌクレオチドは *Candida utilis*のコードン利用性に従って設計された。ポリペプチド配列および縮重オリゴヌクレオチド配列を図11に示す。

PCRにより417bpのバンドが発生し、それをT-ベクター(pMOSBlue, Amersham)にサブクローニングした。上記バンドの配列を完全に決定して、上記DNAフラグメントの翻訳はコンセンサス領域の存在、および文献に報告されている酵素インベルターゼ中における高いホモロジーの存在を確認した。これは、単離されたフラグメントが *Candida utilis*内でこの酵素をコードする *INV1*遺伝子に属することを証明した。このフラグメントを、 *Candida utilis*からの *INV1*遺伝子の単離のためのプローブとして用いた。

*Candida utilis*のライブラリーの検索後、 *INV1*遺伝子を有する計6個のクローンが単離された。これらのクローンの2種を配列決定のためのそれらのサイズに選択し(pCI-6およびpCI-12)、PCRのために前工程のオリゴヌクレオチドを用いた。これらのオリゴヌクレオチドを、プラスミドpCI-6に属する両鎖からの遺伝子の完全な配列決定の開始に使用した。

#### 実施例13: *Candida utilis*の *INV1*遺伝子の配列決定

*Candida utilis*のインベルターゼをコードする *INV1*遺伝子を含有するクローンpCI-6の計2607bpをSangerら(1977)の方法によって完全に配列決定した。この目的には、M13mp/pUCシリーズに属するユニバーサルオリゴヌクレオチドならびにその配列に由来する内部オリゴヌクレオチドを用いた。2607bpフラグメントの完全な配列を図12に示す(配列番号: 5および6)。このフラグメントは1602bp(534コドン)のオープンリーディングフレームを含有する。 *Candida utilis*の *INV1*遺伝子は理論的分子量60,703Daのタンパク質をコードする。

*Candida utilis*中のインベルターゼがペリプラズム酵素であることを考慮すると、それはそのN-末端にシグナルペプチドを有するはずである。この遺伝子

の5'-末端までの配列を分析すると、それらのN-末端のサイズのみが異なるタンパク質をコードするORFに位置を与える2つのコドンATG（図12におけるATG<sub>1</sub>およびATG<sub>2</sub>）が観察される。両ATGから誘導される成熟タンパク質のペプチダーゼシグナルの制限部位を予測するためにフォンハイジンのアルゴリズム（1986, Nucl. Acids Res. 14:4683-4690）を適用すると、両場合についての制限部位は、ATG<sub>1</sub>の場合残基S39とS40の間に、ATG<sub>2</sub>の場合残基S26とS27の間に位置することが明らかである。これはそれぞれ、39および26アミノ酸のシグナルペプチドに代えられる。酵母におけるシグナル配列の平均サイズ（約20残基と推定される）を考慮するとINV1遺伝子の開始コドンは第2のATGであると示唆することができる。

一般的な規則N-X-T/Sに従い、N-グリコシル化部位の可能性のある11個の部位が、位置40, 88, 141, 187, 245, 277, 344, 348, 365, 373, 379および39のアスパラギンに見出された。

5'-非翻訳領域には領域-18~-14および-212~-208に2つの可能性のあるTATAボックス（コンセンサスTATAA）、また様々な可能性が考えられるリプレッサーMgil（コンセンサスSYGGRG）のための合同部位が認められる。

#### 図面の簡単な説明

図1. 大腸菌MC1066pyrFならびに*Saccharomyces cerevisiae* SEY2202ura3突然変異の補足によって*Candida utilis*ゲノムライブラリー中に得られたプラスミドpURA5.

図2. *Candida utilis*からのURA3遺伝子の制限酵素地図、配列決定戦略および補足分析.

図3. プラスミドpURA5の1.9kb EcoRIフラグメントの、pBLUESCRIPT IPT SK (+) 中へのクローン化で得られるプラスミドpUREC3.

図4. URA3遺伝子のDNA配列から推定されるアミノ酸配列、およびそれをコードするDNAのDNA配列.

図5. *Saccharomyces cerevisiae* ura3突然変異株における補足実験のために得られたプラスミドpUT64.

図6. *Candida utilis*のトランスフォーメーション実験に用いられたプラス

ミドpUCURA3.

図7. (A) 相同組換えによってURA3遺伝子座にインテグレートされたベクターDNAの推測されるアレンジメント.

(B) 一部のトランスフォーマントからのゲノムDNAのDNA-プロットハイブリダイゼーション.

図8. HIS3遺伝子の単離に使用されたプライマーのDNA配列, およびそれをコードする推定アミノ酸配列

図9. 大腸菌KC8hisb463突然変異の補足によってCandida utilisゲノムライブラリー中に得られたプラスミドpHCU37.

図10. HIS3遺伝子のDNA配列から推定されるアミノ酸配列, およびそれをコードするDNAのDNA配列.

図11. Candida utilisのINV1遺伝子の単離のためのPCRにおいて使用されたオリゴヌクレオチドのアミノ酸配列および相当するDNA配列.

図12. Candida utilisのINV1遺伝子を含むフラグメントに相当するDNA配列.

## 【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：1179

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ゲノムDNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

起源：

生物名：Candida utilis

株名：NRRL Y-1084

配列の特徴：

特徴を表す記号：mat peptide

存在位置：1..1179

他の情報：産物＝酵素オロチジン-5-リン酸デカルボキシラーゼ

遺伝子＝URA3

配列：

GAAATAGCTC TCTACTTGCT TCTGCTCAAC AAGCTGCTGG AACTGCTGCT GCTCTTTTGG	60
GTTCAATTGG TCCATCCTTG CTACTTTTCC GCCTAGTTTC GATTCCGATT CTGATAGAGA	120
AGCCCAAGCTA TGAATGGAAG AAATTTTCA CTTTTGTATG TCTTTTTTTT CACGCTTCGT	180
TGCTTCGGAC AAAAAAATAG TGGAGGCACT CGGTGGAGGG AAGCTATCCT CGAGATGAAA	240
AATTTCAAGC TCATCTCATC GTCCAAGTGG GACAGCAAGC TGAGGCTTCT GAAGAGGTTG	300
AGGAAAATGG TCACCACGTT ATCGTACACA GAGAGGOCAT CGCACCCCTC GCCACTTGCT	360
AAGCGTCTGT TTTGGCTTAT GGAGTCCAAG AAGACGAACC TGTGTGCCAG TGTGGATGTT	420
CGTACCACAG AGGAGTTGCT CAAGCTCGTT GATACGCTTG GTCCTTATAT CTGTCTGTTG	480
AAGACGCATA TTGATATCAT TGATGACTTC TCTATGGAGT CTACTGTGGC TCCACTGTTG	540
GAGCTTTCAA AAGAGCACAA TTTCCTCATC TTTGAGGACC GTAAGTTTGC TGATATCGGC	600
AACACCGTCA AGGCACAGTA CGCCGGTGGT GCGTTCAAGA TTGCACAATG GGCAGACATC	660

```

ACCAACGCCC ACGGTGTCAC CGGTCGAGGT ATCGTCAAGG GGTGAAGGA GGCTGCACAG      720
GAAACCACGG ATGAGCCCAAG AGGGCTGTTG ATGCTTGCTG AGCTAAGCTC CAAGGGCTCC      780
TTCGCTCACC GGACATATAC CGAGGAGACC GTGGAGATTG CCAAACTGA TAAGGACTTT      840
TGTATTGGAT TCATCGCACA GAGAGACATG GGTGGCAGAG AAGATGGGTT CGACTGGATC      900
ATCATGACAC CAGGCGTGGG ACTCGACGAT AAGGCGGACT CCCTGGGCCA ACAGTACAGA      960
ACTGTCGATG AGGTTGTCAG TGGTGGCTGT GACATCATCA TCCTTGCTAG AGGCTTGTTT     1020
CGAAAGGGAA GAGATCCAAC AGTGGAAAGT GAGCATTATA GAAAGCAGG CTGGGATGCT     1080
TAICTCAAGA GATACTCAGC TCAATAAAGC TTGAGCTCTG GCTTGTATAG GTTCACTTGT     1140
ATAAAATGTT CATTACTGTT TTCGGAAGTT GTAGATTGC      1179

```

配列番号 : 2

配列の長さ : 266

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

ハイボセティカル : No

アンチセンス : No

起源 :

生物名 : *Candida utilis*

株名 : NRRL Y-1084

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : protein

存在位置 : 1..266

配列 :

```

Met Val Thr Thr Leu Ser Tyr Thr Glu Arg Ala Ser His Pro Ser Pro
1           5           10           15
Leu Ala Lys Arg Leu Phe Ser Leu Met Glu Ser Lys Lys Thr Asn Leu
20           25           30
Cys Ala Ser Val Asp Val Arg Thr Thr Glu Glu Leu Leu Lys Leu Val
35           40           45

```

```

Asp Thr Leu Gly Pro Tyr Ile Cys Leu Leu Lys Thr His Ile Asp Ile
 50                      55                      60
Ile Asp Asp Phe Ser Met Glu Ser Thr Val Ala Pro Leu Leu Glu Leu
 65                      70                      75                      80
Ser Lys Glu His Asn Phe Leu Ile Phe Glu Asp Arg Lys Phe Ala Asp
                      85                      90                      95
Ile Gly Asn Thr Val Lys Ala Gln Tyr Ala Gly Gly Ala Phe Lys Ile
                      100                      105                      110
Ala Gln Trp Ala Asp Ile Thr Asn Ala His Gly Val Thr Gly Arg Gly
                      115                      120                      125
Ile Val Lys Gly Leu Lys Glu Ala Ala Gln Glu Thr Thr Asp Glu Pro
 130                      135                      140
Arg Gly Leu Leu Met Leu Ala Glu Leu Ser Ser Lys Gly Ser Phe Ala
 145                      150                      155                      160
His Gly Thr Tyr Thr Glu Glu Thr Val Glu Ile Ala Lys Thr Asp Lys
                      165                      170                      175
Asp Phe Cys Ile Gly Phe Ile Ala Gln Arg Asp Met Gly Gly Arg Glu
                      180                      185                      190
Asp Gly Phe Asp Trp Ile Ile Met Thr Pro Gly Val Gly Leu Asp Asp
 195                      200                      205
Lys Gly Asp Ser Leu Gly Gln Gln Tyr Arg Thr Val Asp Glu Val Val
 210                      215                      220
Ser Gly Gly Cys Asp Ile Ile Ile Val Gly Arg Gly Leu Phe Gly Lys
 225                      230                      235                      240
Gly Arg Asp Pro Thr Val Glu Gly Glu Arg Tyr Arg Lys Ala Gly Trp
                      245                      250                      255
Asp Ala Tyr Leu Lys Arg Tyr Ser Ala Gln
 260                      265

```

配列番号 : 3

配列の長さ : 1190

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ゲノムDNA

ハイボセティカル : No

アンチセンス : No

起源 :



生物名 : *Candida utilis*

株名 : NRRL Y-1084

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : mat peptide

存在位置 : 1..1190

他の情報 : 産物 = 酵素リン酸イミダゾール-グリセロールデヒドロターゼ

遺伝子 = HIS3

配列 :

```

ACCTCCCAAT CGCACAGGCA ACGATACAAA TTCAACGAGT ATTAACCATC TTGTGTGCTA      60
AAAAGATCG AAGAACAACA GTGCGCCAAA AAAAAAATC CGGACCGCAC ACGACTCATC      120
GCTCTCGGAA TATCCCTCGG AATGCGCCAC TTCGGGTTGC GTGGCCATCG GAAGAGCGAA      180
GAGTCATCAC CATCGTACTT TAACGACTTA CTATTCTCAT TGAGTATTGA GAAGAAGGAT      240
AGAGAAATGG CTGAACGAAC GGTGAAACCC CAGAGAAGAG CTCTTGTGAA TCGTACAACA      300
AACGAAACGA AGATCCAGAT TTCCTTGAGT TTGGATGGTG GATACGTAAC GGTCCGGAG      360
TCAATCTTCA AGGATAAGAA GTACGACGAT GCTACTCAAG TCACCTCTTC TCAGGTGATT      420
TCAATCAACA CGGGCGTTGG ATTCTTGGAC CACATGATCC ATGCTCTTGC GAAGCATGGT      480
GGGTGGAGTT TGATTGTGGA GTGTATTGGT GATTTGACCA TTGACGACCA CCACACCACC      540
GAGGACGTTG GTATTGCGCT GGGAGACGCC GTCAAGGAGG CCTTGGCATA TAGAGGTGTC      600
AAGAGATTTG GTAGCGGGTT TGCTCCATTG GACGAGGCTC TGAGCAGAGC CGTTGTGQAT      660
CTGAGTAACC GTCCGTTTGC CGTTGTTGAG CTGGGACTCA AGAGGGAAAA GATCGGTGAC      720
TTGTGATGTG AGATGATTCC TCACTTCTTG GAGAGTTTTG CCCAAGCAGC TCATATCACG      780
ATGCATGTTG ACTGTTTGAG AGGCTTCAAC GACCATCACA GAGCTGAATC CGCATTC AAG      840
GCCCTGGCAG TCGCCATTAA GGAATCCATC TCCAGTAACG GCACCAATGA TGTTCCCTCA      900
ACAAAGGGTG TTTTGTCTA GATAGCAGTC TTTCTGTCTC TCTATTTATT CGATAAATAA      960
GAACTATGTA TATCTTCTC TTTTAATTGT ATATGTACAT GCACAGCTGA CTTCATCAAC     1020
GGAAGATGTT ATGAGTGCA GCCATTGTCT GACTGTGCTT ATCCTTCTTT GCGGATTTAC     1080
CAAGGACTCT ACGACCACTG GTGGCTTTGA TATGATTTCC TGCCAGTACT TGTAAGAGGT     1140
GCAACGTCAA TGGAAACGGC ACCGTTAGCC TTGATGGTTG CACGGGTAGG     1190

```

配列番号：4

配列の長さ：210

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

ハイポセティカル：No

アンチセンス：No

起源：

生物名：Candida utilis

株名：NBRL Y-1084

配列の特徴：

特徴を表す記号：protein

存在位置：1..210

配列：

```

Met Ala Glu Arg Thr Val Lys Pro Gln Arg Arg Ala Leu Val Asn Arg
1          5          10          15
Thr Thr Asn Glu Thr Lys Ile Gln Ile Ser Leu Ser Leu Asp Gly Gly
20          25          30
Tyr Val Thr Val Pro Glu Ser Ile Phe Lys Asp Lys Lys Tyr Asp Asp
35          40          45
Ala Thr Gln Val Thr Ser Ser Gln Val Ile Ser Ile Asn Thr Gly Val
50          55          60
Gly Phe Leu Asp His Met Ile His Ala Leu Ala Lys His Gly Gly Trp
65          70          75          80
Ser Leu Ile Val Glu Cys Ile Gly Asp Leu His Ile Asp Asp His His
85          90          95
Thr Thr Glu Asp Val Gly Ile Ala Leu Gly Asp Ala Val Lys Glu Ala
100         105         110
Leu Ala Tyr Arg Gly Val Lys Arg Phe Gly Ser Gly Phe Ala Pro Leu
115         120         125
Asp Glu Ala Leu Ser Arg Ala Val Val Asp Leu Ser Asn Arg Pro Phe
130         135         140

```

Ala Val Val Glu Leu Gly Leu Lys Arg Glu Lys Ile Gly Asp Leu Ser  
 145 150 155 160  
 Cys Glu Met Ile Pro His Phe Leu Glu Ser Phe Ala Gln Ala Ala His  
 165 170 175  
 Ile Thr Met His Val Asp Cys Leu Arg Gly Phe Asn Asp His His Arg  
 180 185 190  
 Ala Glu Ser Ala Phe Lys Ala Leu Ala Val Ala Ile Lys Glu Ser Ile  
 195 200 205  
 Ser Ser  
 210

配列番号 : 5

配列の長さ : 2607

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ゲノムDNA

ハイボセティカル : No

アンチセンス : No

起源 :

生物名 : *Candida utilis*

株名 : NRRL Y-1084

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : mat peptide

存在位置 : 1..2607

他の情報 : 産物 = 酵素インベルターゼ ( $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ)

遺伝子 = INV1

配列 :

ATCGGCACAG AAGCGACACT GATGTCCTCC GTCTAAAACT CATCGTTTAA TAACTTCTGC	60
ATTGSCAGCT CCGGAGCACA CTCATTGGG ACTAAAGAA GTAACATTTG TACTACAATG	120
AGTCGTATAG AGTCATGTAT AAGAGAAACA GCAAGAAAAG AAAATATTGG TGCAGAATTC	180
AACAGCTTCT GAGATCGTAA GAACAGCCAA TCATTACCG GAATTCATTA TGATACCTAT	240

AGAAAGACAC AAATTGTTGG GTAAAACAAC AGAACATACC TGTATAGGGG TTTATAOGAG	300
AAATTTCTTA GACGTCTCCC CCAGTGTCGG CCAAGGCAAC TTACATGTGG AGTTTGAATT	360
TGGATGCGCC TTTTCCTTTA AACGGTCACC TGAGGTCTGA ATCTCAATGC AATATCATT	420
ACACCAATAA TAAAGGTGCA TATAACCCCA TACCTGTAC ATAAAGAACG GCACATGATC	480
CAATTTATCG ACGTTATGCC TTGTCAGACC ATCGTCGTGA ACTTTTCTAA ACCGGATAAA	540
CTCTCGCAGG GATTATAACG TGCGTCGTG ATATGCACTC CGGAAAAAAC CCGCGTGGAG	600
AAGTGAAGCG GCCACCTGTC GAGCAGAAAT TTCGATCGAC GTTTCAGTT CAAATGGTTT	660
CCTGTGTCA AAGGGCTTGA GATTTACCAC TTGAGCATTI GTGCTCAGAA TTCGGAGAGC	720
ATTCCCATGA GTGGTGTCCA AAAACACTAT AAAAGCAGCA CAGGGATGTC GTTGACAAA	780
GATGCCTCAG AGGAUCAAAG AGACATCAAG AGTCTCAGG TGAACACTAG TTTAGTTGAT	840
TCCAGCATTI ACAGACCATT AGTCCATCTA ACGCCACCAG TGGGGTGGAT GAACGACCCT	900
AATGGTCTCT TCTACGATTC ATCTGAATCT ACTTACCATG TGTACTACCA ATACAACCCA	960
AACGATACGA TTTGGGGATT GCCTCTATAT TGGGGACATG CCACCTCTGA TGATTTGTTA	1020
ACGTGGGACC ACCATGCGCC TGCAATTGGA CCTGAGAATG ATGATGAGGG TATTTACTCT	1080
GGATCTATAG TCATAGACTA CGATAATACC TCAGGGTCTT TTGACGATTC AACAGACCA	1140
GAACAGAGAA TCGTTGCCAT TTATACCAAT AACTTACCAG ATGTCGAGAC GCAAGACATT	1200
GCCTATTCCA CGGACGGTGG TTATACTTTC GAAAAGTATG AAAACAACCC AGTTATAGAC	1260
GTCAATTGGA CCCAATTAG GATCCGAAG GTGATTGGCT ATGAGGAAAC TGAACAATGG	1320
GTCACTACTG TGGCAAAGAG TCAAGAGTAC AAGATCCAGA TTTACACCTC TGACAATTTG	1380
AAAGACTGGA GTTTGGCCTC GAATTTCTCA ACCAAGGOTT ATGTTGGTTA TCAGTATGAA	1440
TOTCCAGGTC TATTGGAAGC CACTATTGAA AACCCAAAGA GTGGTGACCC AGAGAAGAAA	1500
TGGGTTATGG TCTTAGCAAT CAATCCAGGC TCACCTCTTG GTGGTTCCAT AAATGAATAC	1560
TTGTTTGGTG AITTCACGG TACTGAATTC ATTCCAGATG ATGACGCTAC AAGATTTATG	1620
GATACTGGTA AGGACTTCTA TGCCTTCCAA GCGTTCTTCA ATGCACCGGA GAATCGGTCA	1680
ATTGGAGTTG CTGGTGCATC GAACTGGCAG TATTCCAACC AGGTTCGGA TCCTGATGGA	1740
TATAGAAGCT CCATGTGATC AATCAGAGAG TACACTCTGA GATATGTCAG TACGAATCCA	1800
GAATCTGAAC AGTTGATCCT TTGTCAAAAA CCATTCTTTG TGAACGAGAC AGACTTGAAG	1860
GTGGTTGAAG AGTACAAGGT TTCAAACAGT TCTTTGACCG TGGACCACAC GTTTGGAAGT	1920
AGCTTTGCAA ACTCCAACAC CACTGGACTG TTGGATTTC AATGACTTT CACGGTTAAC	1980
GGTACAACTG ACGTTACGCA GAAGGACTCC GTCACCTTTG AGCTCAGAA CAAATCTAAC	2040

```

CAAAGCGACG AGGCAATTGC GCTTGATTAC GATTACAACA ACGAGCAATT CTACATCAAC   2100
AGAGCCACAG AGAGCTACTT CCAGAGAACC AACCAGTTCT TCCAGGAAGAG ATGGTCCACG   2160
TACGTTACAG CTCTCACAAT CACCGAATCT GGTGATAAAC ACTACCAGCT CTACGGATTG   2220
GTTGATAACA ACATCCTTGA GTTGTAATTC AACGACGGGG CATTACATC CACAAACACC   2280
TTCTTCTTGG AGAAGGGCAA GCCATCAAAC GTCGATATCG TGGCAAGCTC CTCCAAGGAG   2340
GCTTACCACC GTGGACCAGC TGACTGAGAC GTCTCACTGT TTGACGAATA CGCACGTGAA   2400
AGCTATATAA GGGATCACGT GGTCTAGCCA CCCAGTCTA AAAGCTTCAG CAAACCGCCA   2460
CTATATAAAC AGACAGGTTT GTCACTTTTC AACAAAACAA ATATCTTCTT CTTTACCCCT   2520
TCAGAGTAGT TTGTACGAGT GCTTTTTTCA ATTATATATA CAACAACGTG AGCTGCCTTT   2580
GGATATGCAA TCAACAGCGC TCTCTTTT                                     2607

```

配列番号 : 6

配列の長さ : 533

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

ハイポセティカル : No

アンチセンス : No

起源 :

生物名 : *Candida utilis*

株名 : NRRL Y-1084

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : protein

存在位置 : 1..533

配列 :

```

Met Ser Leu Thr Lys Asp Ala Ser Glu Asp Gln Glu Asp Ile Lys Ser
1          5          10          15

Leu Thr Met Asn Thr Ser Leu Val Asp Ser Ser Ile Tyr Arg Pro Leu
          20          25          30

Val His Leu Thr Pro Pro Val Gly Trp Met Asn Asp Pro Asn Gly Leu
          35          40          45

```

Phe Tyr Asp Ser Ser Glu Ser Thr Tyr His Val Tyr Tyr Gln Tyr Asn  
 50 55 60  
 Pro Asn Asp Thr Ile Trp Gly Leu Pro Leu Tyr Trp Gly His Ala Thr  
 65 70 75 80  
 Ser Asp Asp Leu Leu Thr Trp Asp His His Ala Pro Ala Ile Gly Pro  
 85 90 95  
 Glu Asn Asp Asp Glu Gly Ile Tyr Ser Gly Ser Ile Val Ile Asp Tyr  
 100 105 110  
 Asp Asn Thr Ser Gly Phe Phe Asp Asp Ser Thr Arg Pro Glu Gln Arg  
 115 120 125  
 Ile Val Ala Ile Tyr Thr Asn Asn Leu Pro Asp Val Glu Thr Gln Asp  
 130 135 140  
 Ile Ala Tyr Ser Thr Asp Gly Gly Tyr Thr Phe Glu Lys Tyr Glu Asn  
 145 150 155 160  
 Asn Pro Val Ile Asp Val Asn Ser Thr Gln Phe Arg Asp Pro Lys Val  
 165 170 175  
 Ile Trp Tyr Glu Glu Thr Glu Gln Trp Val Met Thr Val Ala Lys Ser  
 180 185 190  
 Gln Glu Tyr Lys Ile Gln Ile Tyr Thr Ser Asp Asn Leu Lys Asp Trp  
 195 200 205  
 Ser Leu Ala Ser Asn Phe Ser Thr Lys Gly Tyr Val Gly Tyr Gln Tyr  
 210 215 220  
 Glu Cys Pro Gly Leu Phe Glu Ala Thr Ile Glu Asn Pro Lys Ser Gly  
 225 230 235 240  
 Asp Pro Glu Lys Lys Trp Val Met Val Leu Ala Ile Asn Pro Gly Ser  
 245 250 255  
 Pro Leu Gly Gly Ser Ile Asn Glu Tyr Phe Val Gly Asp Phe Asn Gly  
 260 265 270  
 Thr Glu Phe Ile Pro Asp Asp Asp Ala Thr Arg Phe Met Asp Thr Gly  
 275 280 285  
 Lys Asp Phe Tyr Ala Phe Gln Ala Phe Phe Asn Ala Pro Glu Asn Arg  
 290 295 300  
 Ser Ile Gly Val Ala Trp Ser Ser Asn Trp Gln Tyr Ser Asn Gln Val  
 305 310 315 320  
 Pro Asp Pro Asp Gly Tyr Arg Ser Ser Met Ser Ser Ile Arg Glu Tyr  
 325 330 335  
 Thr Leu Arg Tyr Val Ser Thr Asn Pro Glu Ser Glu Gln Leu Ile Leu  
 340 345 350  
 Cys Gln Lys Pro Phe Phe Val Asn Glu Thr Asp Leu Lys Val Val Glu  
 355 360 365

[illegible]

【図1】

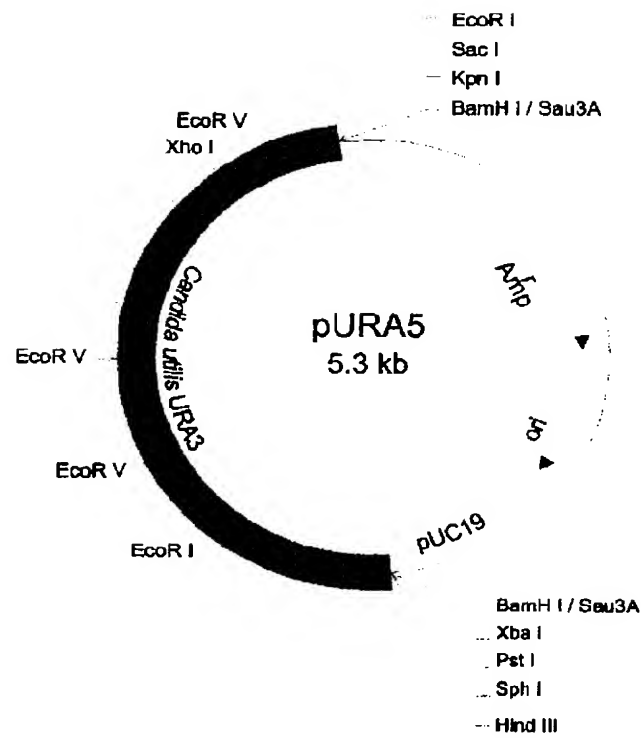
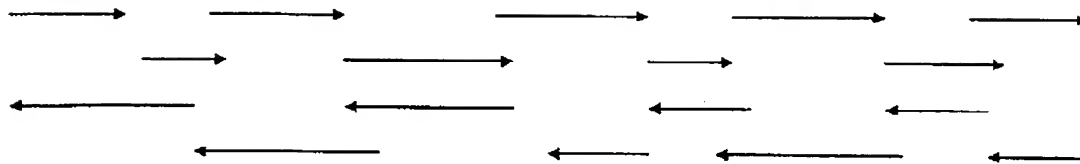
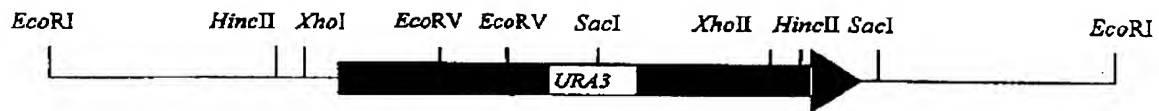


Figura 1



【図2】



プラスミド  
Plasmid

フラグメント  
Fragment

*pyrF* 補足  
Complementation

pUREc-3

*EcoRI* (1.9 kb)

+++

pURSac-4

*SacI* (1.1 kb)

-

pURHinc-1

*HincII* (1.2 kb)

+++

Figure 2

【図 3】

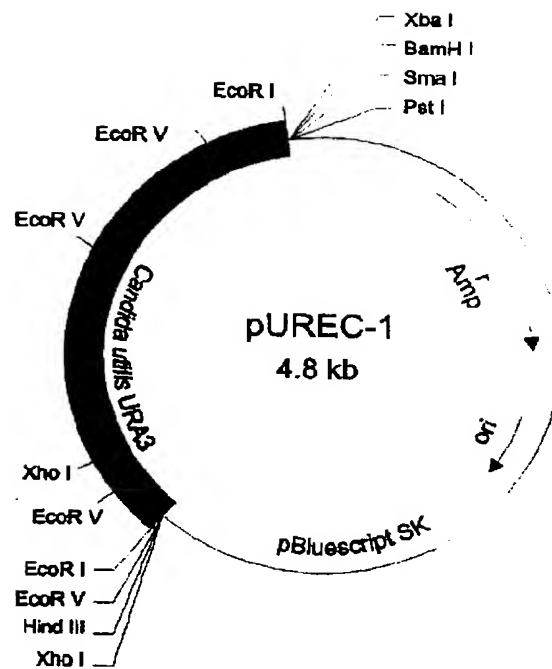


Figura 3

## 【図4】

					6	16	26
					caaata gctctctact tgcctctgct		
36	46	56	66	76	86	96	
caacaagctg	ctggaactgc	tgctgctctt	ttgggttcaa	ttgggtccatc	cttgctactt	ttcgccttag	
106	116	126	136	146	156	166	
tttcgattcc	gattctgata	gagaagccca	gctatgaatg	gaagaaattt	ttcacttttg	tatgtccttt	
176	186	196	206	216	226	236	
ttttcacgct	tcgttgcttc	ggacaaaaaa	atagtggagg	cactcgggtg	agggaagcta	tcctcgagat	
246	256	266	276	286	296	306	
gaaaaatttc	aagctcatct	catcgtccaa	gtgggacagc	aagctgaggc	ttctgaagag	gttgaggaaa	
	318	327	336	345	354	363	
M	V	T	T	L	S	Y	T
atg	gtc	acc	acg	tta	tcg	tac	aca
	375	384	393	402	411	420	
R	L	F	S	L	M	E	S
cgt	ctg	ttt	tcg	ctt	atg	gag	tcc
	432	441	450	459	468	477	
R	T	T	E	E	L	L	K
cgt	acc	aca	gag	gag	ttg	ctc	aag
	489	498	507	516	525	534	
L	K	T	H	I	D	I	I
ttg	aag	acg	cat	att	gat	atc	att
	546	555	564	573	582	591	
L	L	E	L	S	K	E	H
ctg	ttg	gag	ctt	tca	aaa	gag	cac
	603	612	621	630	639	648	
D	I	G	N	T	V	K	A
gat	atc	ggc	aac	acc	gtc	aag	gca
	660	669	678	687	696	705	
W	A	D	I	T	N	A	H
tgg	gca	gac	atc	acc	aac	gcc	cac
	717	726	735	744	753	762	
K	E	A	A	Q	E	T	T
aag	gag	gct	gca	cag	gaa	acc	acg
	774	783	792	801	810	819	
L	S	S	K	G	S	F	A
cta	agc	tcc	aag	ggc	tcc	ttc	gct

## 【図4】

831				840				849				858				867				876			
A	K	T	D	K	D	F	C	I	G	F	I	A	Q	R	D	M	G	G					
gcc	aaa	act	gat	aag	gac	ttt	tgt	att	gga	ttc	atc	gca	cag	aga	gac	atg	ggt	ggc					
888				897				906				915				924				933			
R	E	D	G	F	D	W	I	I	M	T	P	G	V	G	L	D	D	K					
aga	gaa	gat	ggg	ttc	gac	tgg	atc	atc	atg	aca	cca	ggc	gtg	gga	ctc	gac	gat	aag					
945				954				963				972				981				990			
G	D	S	L	G	Q	Q	Y	R	T	V	D	E	V	V	S	G	G	C					
ggc	gac	tcc	ctg	ggc	caa	cag	tac	aga	act	gtc	gat	gag	gtt	gtc	agt	ggt	ggc	tgt					
1002				1011				1020				1029				1038				1047			
D	I	I	I	V	G	R	G	L	F	G	K	G	R	D	P	T	V	E					
gac	atc	atc	atc	gtt	ggt	aga	ggc	ttg	ttt	gga	aag	gga	aga	gat	cca	aca	gtg	gaa					
1059				1068				1077				1086				1095				1104			
G	E	R	Y	R	K	A	G	W	D	A	Y	L	K	R	Y	S	A	Q					
ggt	gag	cgt	tat	aga	aaa	gca	ggc	tgg	gat	gct	tat	ctc	aag	aga	tac	tca	gct	caa					
1123				1133				1143				1153				1163				1173			
*																							
taa acgttg agctctggct tgtatagggt cacttgtata aaatgttcat tactgttttc ggaagttgta																							
gattgc																							

Figura 4

【図5】

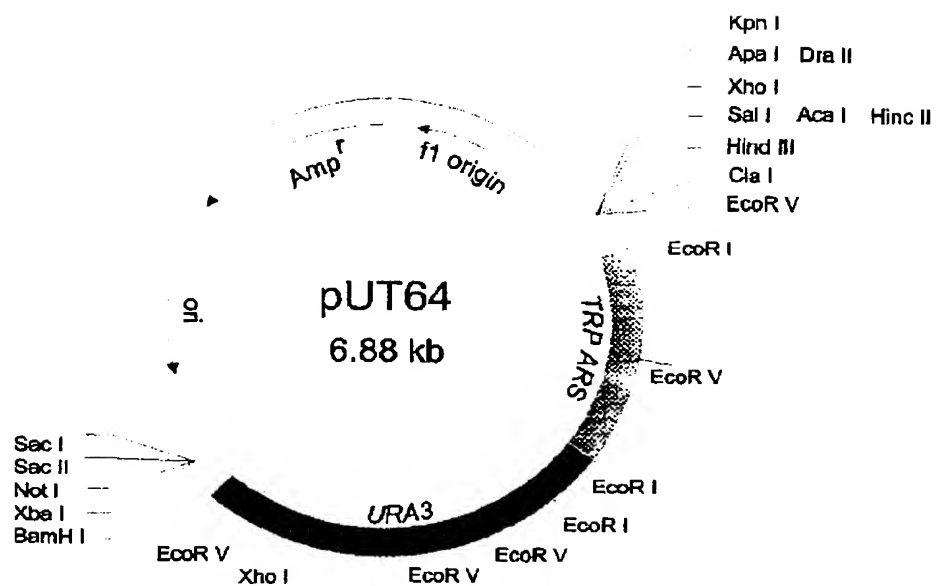


Figura 5

【図6】

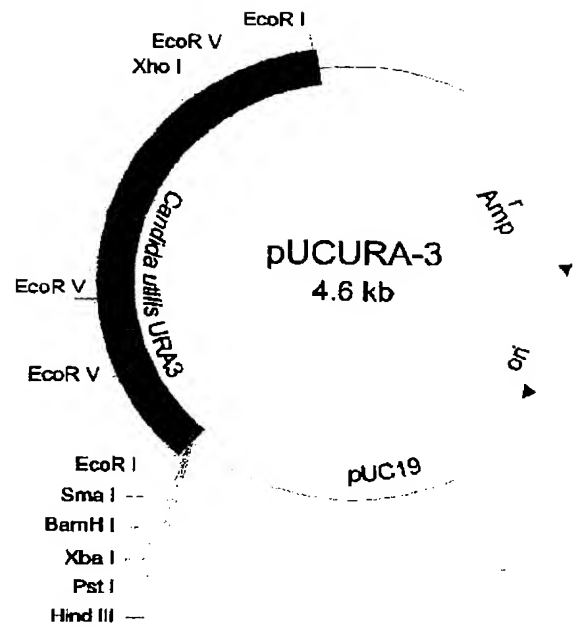


Figura 6

【図7】

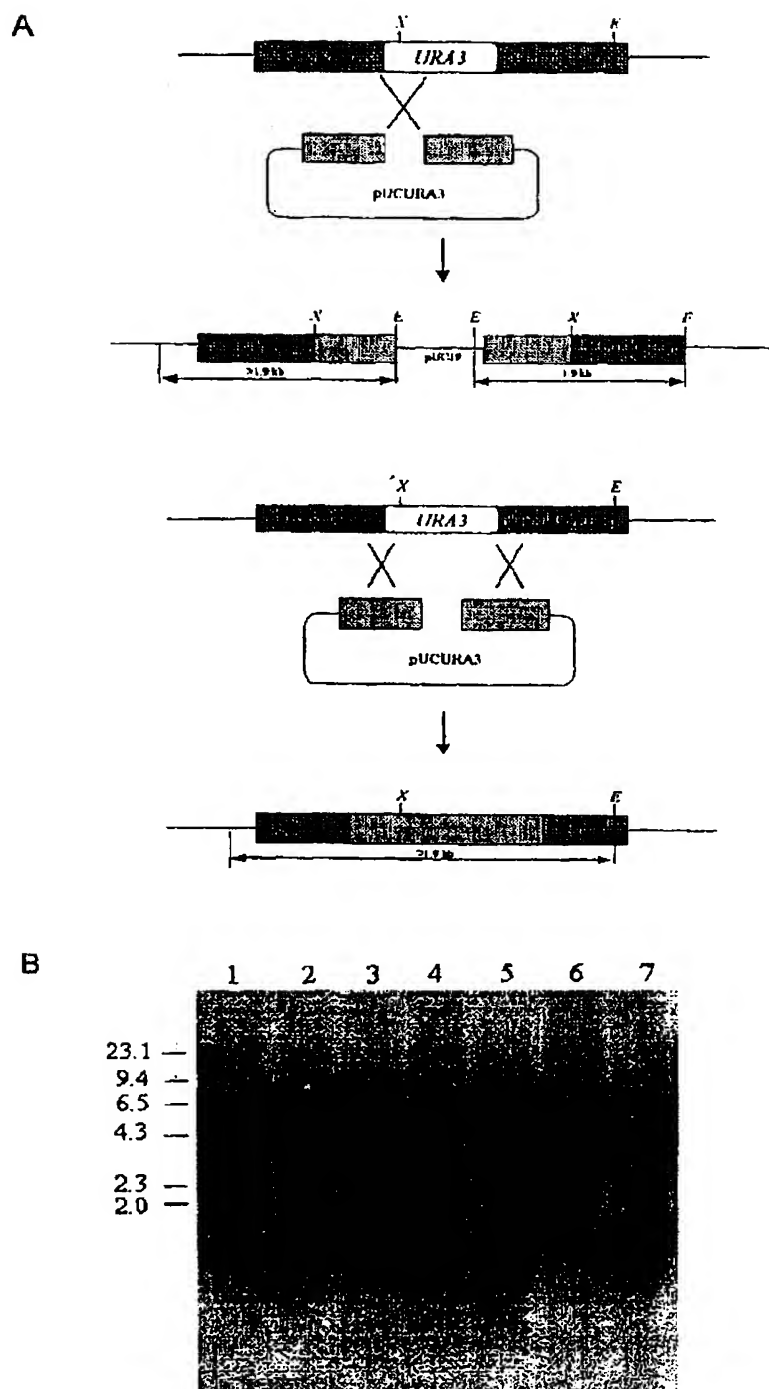


Figura 7

【図8】

	G	V	G	F	L	D	H	M	
5'	GGT	ATT	GGY	TTY	TTG	GAY	CAY	ATG	3' (Primer 5')
	P	S	T	K	G	V	L	M	
5'	CAA	RAC	ACC	YTT	GGT	KGW	TGG	RCC	3' (Primer 3')

Figure 8



【図9】

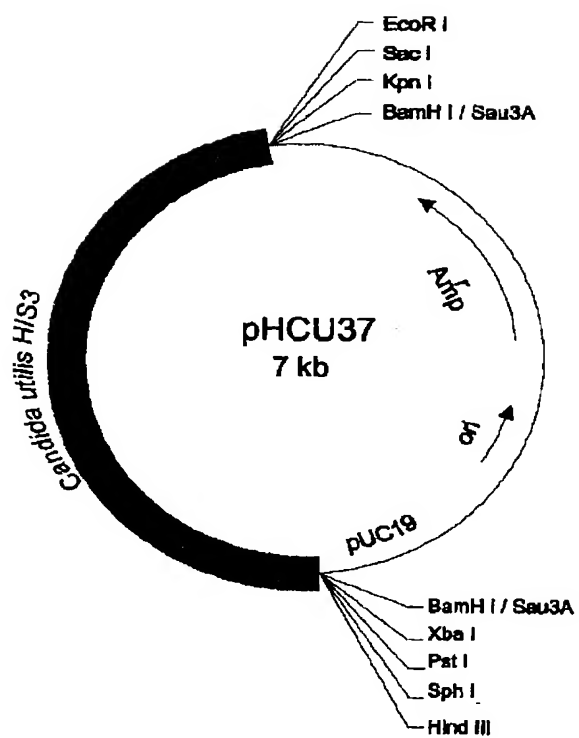


Figure 9

## 【図10】

									6			16			26			36
									acctcc	caatcg	caca	ggcaac	gata	caaatt	caac			
46		56				66			76			86			96			106
gagtattaac catcttgtgt gctaaaaaga gtcgaagaac aacagtgcgc caaaaaaaaa actccggacc																		
116		126				136			146			156			166			176
gcacacgact catcgctctc ggaatatccc tcggaatgcg ccacttccgg gtgcgtggcc atcggaagag																		
186		196				206			216			226			236			246
cgaagagtca tcaccatcgt actttaacga cttactattc tcattgagta ttgagaagaa ggatagagaa																		
		258				267			276			285			294			303
M	A	E	R	T	V	K	P	Q	R	R	A	L	V	N	R	T	T	N
atg gct gaa cga acg gtg aaa ccc cag aga aga gct ctt gtg aat cgt aca aca aac																		
		315				324			333			342			351			360
E T K I Q I S L S L D G G Y V T V P E																		
gaa acg aag atc cag att tcc ttg agt ttg gat ggt gga tac gta acg gtt ccg gag																		
		372				381			390			399			408			417
S I F K D K K Y D D A T Q V T S S Q V																		
tca atc ttc aag gat aag aag tac gac gat gct act caa gtc acc tct tct cag gtg																		
		429				438			447			456			465			474
I S I N T G V G F L D H M I H A L A K																		
att tca atc aac acg ggc gtt gga ttc ctg gac cac atg atc cat gct ctt gcg aag																		
		486				495			504			513			522			531
H G G W S L I V E C I G D L H I D D H																		
cat ggt ggg tgg agt ttg att gtg gag tgt att ggt gat ttg cac att gac gac cac																		
		543				552			561			570			579			588
H T T E D V G I A L G D A V K E A L A																		
cac acc acc gag gac gtt ggt att gcg ctg gga gac gcc gtc aag gag gcc ttg gca																		
		600				609			618			627			636			645
Y R G V K R F G S G F A P L D E A L S																		
tat aga ggt gtc aag aga ttt ggt agc ggg ttt gct cca ttg gac gag gct ctg agc																		
		657				666			675			684			693			702
R A V V D L S N R P F A V V E L G L K																		
aga gcc gtt gtt gat ctg agt aac cgt ccg ttt gcc gtt gtt gag ctg gga ctc aag																		
		714				723			732			741			750			759
R E K I G D L S C E M I P H F L E S F																		
agg gaa aag atc ggt gac ttg tca tgt gag atg att cct cac ttc ttg gag agt ttt																		
		771				780			789			798			807			816
A Q A A H I T M H V D C L R G F N D H																		
gcc caa gca gct cat atc acg atg cat gtt gac tgt ttg aga ggc ttc aac gac cat																		
		828				837			846			855			864			873
H R A E S A F K A L A V A I K E S I S																		

## 【図10】

```

cac aga gct gaa tcc gca ttc aag gcc ctg gca gtc gcc att aag gaa tcc atc tcc
      885      894      903      912      921      932
S   N   G   T   N   D   V   P   S   T   K   G   V   L   F   *
agt aac ggc acc aat gat gtt ccc tca aca aag ggt gtt ttg ttc tag a tagcagtctt
      942      952      962      972      982      992      1002
tctgtctctc tatttattcg ataaataaga actatgtata tctttctctt ttaattgtat atgtacatgc
      1012      1022      1032      1042      1052      1062      1072
acagctgact ccatcaacgg aagatgttat tgagtgcagc cattgtctga ctgtcgttat ccttctttgc
      1082      1092      1102      1112      1122      1132      1142
ggatttacca aggactctac gaccactggt ggctttgata tgatgtcctg ccagtacttg taagaggtgc
      1152      1162      1172      1182      1192      1202
aacgtcaatg gaaacggcac cgtagcctt gatggttgca cgggtaggac tcacagccaa gacgg

```

Figura 10

【図11】

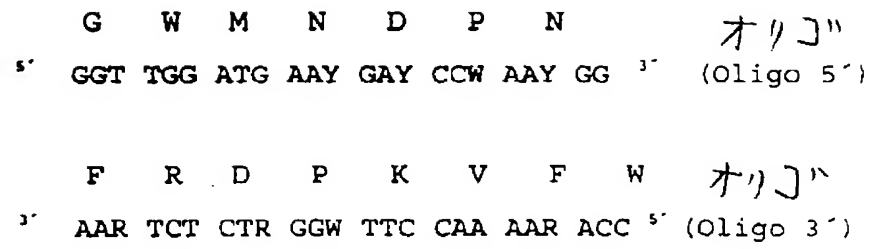


Figure 11

## 【図12】

```

tcgg cacagaagcg acactgatgt cctccgtcta aaactcatcg ttttaataact tctgcattgg 65
cagctccgga gcacactcaa ttgggactaa aagaagtaac atttgtacta caatgagtcg tatagagtcg 131
tgtataagaa gaacagcaag aaaagaaaat attggtgcag aattcaacag cttctgagat cgtaagaaca 208
gccaatcatt taccggaatt cattatgata cctatagaaa gacacaaatt gttgggtaaa acaacagaaac 275
atacctgtat aggggtttat acgagaatct tcttagacgt ctccccaggt gtccgccaaa gcaacttaca 345
tgtggagttt gaatttggat ggccttttct ctttaaacgg tcacctgagg tctgaatctc aatgcaaata 415
tcattacacc aataataaag gtgcatataa ccccataacc tgtacataaa gaacggcaca tgatccaatt 485
tatcgacgtt atgccttgtc agaccatcgt cgtgaacttt tctaaaccgg ataaactctc gcacggatta 555
taacgtgcgt ctgtgatatg cactccggaa aaaacccccg tggagaagtg aagcggccac ctgtggagca 625
gaaatttcga tcgacgtttc aagttcaaat ggtttcctgt tgtcaaagggt cttgagattt accacttgag 695
catttgtgct cagaattcgg agagcattcc cATG1agtgggt gtccaaaaac actataaaaag cagcacaggg 765
M S L T K D A S E D Q E D I K S L T M
ATG, tcg ttg aca aaa gat gcc tca gag gac caa gaa gac atc aag agt ctc acg atg 822
N T S L V D S S I Y R P L V H L T P P
aac act agt tta gtt gat tcc agc att tac aga cca tta gtc cat cta acg cca cca 879
V G W M N D P N G L F Y D S S E S T Y
gtg ggg tgg atg aac gac cct aat ggt ctc ttc tac gat tca tct gaa tct act tac 936
H V Y Y Q Y N P N D T I W G L P L Y W
cat gtg tac tac caa tac aac cca aac gat acg att tgg gga ttg cct cta tat tgg 993
G H A T S D D L L T W D H H A P A : J
gga cat gcc acc tct gat gat ttg tta acg tgg gac cac cat gcg cct gca att gga 1050
P E N D D E G I Y S G S I V I D Y D N
cct gag aat gat gat gag ggt att tac tot gga tct ata gtc ata gac tac gat aat 1107
T S G F F D D S T R P E Q R I V A I Y
acc tca ggg ttc ttt gac gat tca aca aga cca gaa cag aga atc gtt gcc att tat 1164
T N N L P D V E T Q D I A Y S T D G G
acc aat aac tta cca gat gtc gag acg caa gac att gcc tat tcc acg gac ggt ggt 1221
Y T F E K Y E N N P V I D V N S T Q F
tat act ttc gaa aag tat gaa aac aac cca gtt ata gac gtc aat tcg acc caa ttt 1278
R D P K V I W Y E E T E Q W V M T V A
agg gat ccg aag gtg att tgg tat gag gaa act gaa caa tgg gtc atg act gtg gca 1335
K S Q E Y K I Q I Y T S D N L K D W S
aag agt caa gag tac aag atc cag att tac acc tct gac aat ttg aaa gac tgg agt 1392
L A S N F S T K G Y V G Y Q Y E C P G
ttg gcc tcg aat ttc tca acc aag ggt tat gtt ggt tat' cag tat gaa tgt cca ggt 1449
L F E A T I E N P K S G D P E K K W V
cta ttc gaa gcc act att gaa aac cca aag agt ggt gac 'cca gag aag aaa tgg gtt 1506
M V L A I N P G S P L G G S I N E Y F
atg gtc tta gca atc aat cca ggc tca cct ctt ggt ggt tcc ata aat gaa tac ttt 1563
V G D F N G T E F I P D D D A T R F M

```

## 【図12】

```

gtt ggt gat ttc aac ggt act gaa ttc att cca gat gat gac gct aca aga ttt atg 1620
D T G K D F Y A F Q A F F N A P E N R
gat act ggt aag gac ttc tat gcc ttc caa gcg ttc ttc aat gca ccg gag aat cgg 1677
S I G V A W S S N W Q Y S N Q V P D P
tca att gga gtt gcc tgg tca tcg aac tgg cag tat tcc aac cag gtt ccg gat cct 1734
D G Y R S S M S S I R E Y T L R Y V S
gat gga tat aga agc tcc atg tca tca atc aga gag tac act ctg aga tat gtc agt 1791
T N P E S E Q L I L C Q K P F F V N E
acg aat cca gaa tct gaa cag ttg atc ctt tgt caa aaa cca ttc ttt gtg aac gag 1848
T D L K V V E E Y K V S N S S L T V D
aca gac ttg aag gtg gtt gaa gag tac aag gtt tca aac agt tct ttg acc gtg gac 1905
H T F G S S F A N S N T T G L L D F N
cac acg ttt gga agt agc ttt gca aac tcc aac acc act gga ctg ttg gat ttc aac 1962
M T F T V N G T T D V T Q K D S V T F
atg act ttc acg gtt aac ggt aca act gac gtt acg cag aag gac tcc gtc acc ttt 2019
E L R I K S N Q S D E A I A L G Y D Y
gag ctg aga atc aaa tct aac caa agc gac gag gca att gcg ctt ggt tac gat tac 2076
N N E Q F Y I N R A T E S Y F Q R T N
aac aac gag caa ttc tac atc aac aga gcc aca gag agc tac ttc cag aga acc aac 2133
Q F F Q E R W S T Y V Q P L T I T E S
cag ttc ttc cag gag aga tgg tcc acg tac gtt cag cct ctg aca atc acc gaa tct 2190
G D K Q Y Q L Y G L V D N N I L E L Y
ggt gat aaa cag tac cag ctg tac gga ttg gtt gat aac aac atc ctt gag ttg tac 2247
F N D G A F T S T N T F F L E K G K P
ttc aac gac ggg gca ttc aca tcc aca aac acc ttc ttc ttg gag aag ggc aag cca 2304
S N V D I V A S S S K E A Y H R G P A
tca aac gtc gat atc gtg gca agc tcc tcc aag gag gct tac cac cgt gga cca gct 2361
D *
gac tga ga cgtctcactg tttagcgaat acgcacgtga aagctatata agggatcacg tgggtctagcc 2429
aocccagtct aaaagcttca gaaaaccgcc actatataaa cagacagggt tgtcactttt caacaaaaca 2499
aatatcttct tcttttacct ttcagagtag tttagtacgag tgcttttttt aattatatat acaacaacgt 2569
gagctgcctt tggatatgca atcaacagcg ctctcttt
2599

```

Figura 12

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 C12N15/81 C12N9/88 C12N9/26		International Application No. PCT/CU 97/00005
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 717 107 A (KIRIN BEER KK) 19 June 1996  see page 2, line 40 - page 3, line 40 see page 14, line 26 - line 37 see page 17, line 34 - page 18, line 19 see page 19, line 23 - page 20, line 45 see page 22, line 1 - line 20 see claims 10-13  --- -/--	1-4, 9-11, 27-34, 39-41,44
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "B" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  27 January 1998		Date of mailing of the international search report  20.02.98
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 601, Fax. (+31-70) 340-3016		Authorized officer  De Kok, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/CU 97/00005

C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	K. HAMASAWA ET AL.: "Molecular cloning and nucleotide sequence of the 3-isopropylmalate dehydrogenase gene of <i>Candida utilis</i> " JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, vol. 133, 1987, LONDON GB, pages 1089-1097, XP002053487 see page 1089 ---	1,2
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 009, no. 012 (C-261), 18 January 1985 & JP 59 162884 A (KOJIN KK), 13 September 1984, see abstract ---	1
Y	KITADA K ET AL: "Cloning of the <i>Candida glabrata</i> TRP1 and HIS3 genes, and construction of their disruptant strains by sequential integrative transformation" GENE, vol. 165, no. 2, 20 November 1995, AMSTERDAM NL, pages 203-206, XP004043142 see the whole document ---	6-8,12, 13, 19-21, 25,26, 36-38, 42,43
Y	OHI R ET AL: "Construction of vectors and a genomic library for use with his3-deficient strains of <i>Schizosaccharomyces pombe</i> " GENE, vol. 174, no. 2, 1996, AMSTERDAM NL, pages 315-318, XP004043282 see the whole document ---	6-8,12, 13, 19-21, 25,26, 36-38, 42,43
Y	EP 0 127 304 A (GENENTECH INC) 5 December 1984 see the whole document, especially figure 13 ---	46
Y	CHAVEZ F P ET AL: "Purification and characterization of an invertase from <i>Candida utilis</i> " ADVANCES EN BIOTECNOLOGIA MODERNA, vol. 3, 1995, XP002052628 see abstract ---	46
A	WO 90 09449 A (HENKEL RESEARCH CORP) 23 August 1990 see page 4, line 11 - page 5, line 10 -----	1-45



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat. Application No  
PCT/CU 97/00005

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0717107 A	19-06-96	JP 8173170 A	09-07-96
		AU 2537795 A	18-12-95
		FI 960331 A	20-03-96
		NO 960247 A	22-03-96
		CA 2168037 A	30-11-95
		WO 9532289 A	30-11-95
EP 0127304 A	05-12-84	AU 2721884 A	01-11-84
		DK 204884 A	07-12-84
		JP 60041488 A	05-03-85
WO 9009449 A	23-08-90	US 5204252 A	20-04-93
		CA 2046641 A	09-08-90
		EP 0457852 A	27-11-91
		JP 4505557 T	01-10-92

## フロントページの続き

- (72)発明者 シャベズ, エスピノザ, フランシソ パブ  
ロ  
キューバ国13400 シウダド デ ラ ハ  
バナ, セロ, カレ 7マ ナンバー 2305  
エントレ 4タ イ アラングレン
- (72)発明者 ゴンザレス, マルチネズ, マリア エレナ  
キューバ国12300 シウダド デ ラ ハ  
バナ, プラザ デ ラ レボリューショ  
ン, ベダド, カレ 26 ナンバー 1002
- (72)発明者 リベロ, バエザ, タニロ  
キューバ国11300 シウダド デ ラ ハ  
バナ, プラヤ, レバルト セイバ, カレ  
58ビー ナンバー 6703 エントレ 47  
イ 49
- (72)発明者 ベサベ, ツエロ, リリアナ  
キューバ国12100 シウダド デ ラ ハ  
バナ, プラヤ, キューバナキャン, カレ  
186 ナンバー 3115 エントレ 31 イ  
33, アパートメント 3シー
- (72)発明者 パイフェル, レイエス, エデニア  
キューバ国12100 シウダド デ ラ ハ  
バナ, プラヤ, キューバナキャン, カレ  
184 ナンバー 3112 エントレ 31 イ  
33, アパートメント 41
- (72)発明者 デルガド, ボアダ, ジュリオ マルコス  
キューバ国12100 シウダド デ ラ ハ  
バナ, プラヤ, キューバナキャン, カレ  
184 ナンバー 3112 エントレ 31 イ  
33, アパートメント 52